粘虫飞行过程中四种相关酶的活性变化

李克斌[1,2], 高希武[2], 罗礼智[1], 尹 姣[1], 曹雅忠[1*]
(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100094;2. 中国农业大学, 北京 100094)

摘要:对3日龄粘虫雌蛾吊飞过程中4种相关酶3-羟酰辅酶A脱氢酶(HOAD)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、3-磷酸甘油脱氢酶(GDH)和乳酸脱氢酶(LDH)的研究结果表明,在室内条件下,粘虫在吊飞过程中其能量代谢有以下特点:在吊飞的初始5 min,所有与糖代谢和脂肪代谢相关的酶活性都快速升高,这段时期脂肪代谢的酶活性也完全被活化,HOAD活性明显增强;但在随后的5~60 min持续吊飞期间与能量代谢有关的酶活性都有所下降,表明此时飞行活性趋于平稳。飞行中的粘虫具有极高的有氧代谢能力,也具备一定的无氧代谢能力。吊飞过程中HOAD:GAPDH大于1,说明粘虫飞行过程中能源物质利用属于混合型,但动用脂肪比糖类要多。

关键词:粘虫;吊飞;酶活性;3-羟酰辅酶A脱氢酶;3-磷酸甘油醛脱氢酶
中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2005)04-0643-05

Changes in activities of four energy metabolism related enzymes during flight of *Mythimna separata*

LI Ke-Bin[1,2], GAO Xi-Wu[2], LUO LI-Zhi[1], YIN Jiao[1], CAO Ya-Zhong[1*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insects, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The effect of the flight on the activities of energy metabolism related enzymes in the flight muscles of the Oriental armyworm moth, *Mythimna separata* females was studied. These enzymes measured were glyceraldehydes-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GDH), lactate dehydrogenase (LDH), and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD). In the first 5 min of the tethered-flight of 3 day-old moth, activities of all the enzymes related to carbohydrate and lipid metabolism increased rapidly, enzymes related to lipid metabolism were completely activated, and the activities of HOAD were significantly strengthened. But in flight duration from 5th to 60th min, the activities of all energy metabolism related enzymes decreased, suggesting that the flight was going to be stabilized. High levels of GDH and LDH activities during flight suggested that both aerobic and anaerobic metabolism happened in flight muscle. The ratio of HOAD:GAPDH suggested that not only lipids but also carbohydrates in the female could be involved as energy substrates in the process of flight activity.

Key words: *Mythimna separata*; tethered-flight; enzyme activity; HOAD; GAPDH

昆虫的飞行过程可以利用脂类、糖类、氨基酸中的一种或者多种为其提供所需能源(Rankin *et al*., 1992)。在昆虫飞行过程中的代谢速率甚至可以达到静息状态的20~100倍,这在目前已经了解的动物中是最高的(Kammer and Heinrich, 1978; Beenakkers *et al*., 1984)。昆虫的这种高的代谢速度与飞行肌的结构及飞行相关的酶关系密切。到目前为止,与昆虫能量代谢有关的问题前人已经做过一些研究,但与鳞翅目相关的研究报道相对较少。Beenakkers (1969)通过对数种昆虫的研究认为,东亚飞蝗 *Locusta migratoria* HOAD:GAPDH的比值接近于1.0,属于糖类和脂肪都可以利用的能量混合利用型;小柏天蛾 *Philosamia cynthia* 的二者比值远大于1,主要利用脂肪作为飞行能源;而红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 及大多数双翅目昆虫这两种酶的比值均远小于1.0,它们主要利用糖类为飞行

基金项目:国家重点基础研究发展规划'973'项目(G2000016206)
作者简介:李克斌,男,1968年3月生,副研究员,博士,从事昆虫生理生化的研究,E-mail:likebin54@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:yazhongcao@sina.com
收稿日期 Received:2005-01-26;接受日期 Accepted:2005-06-04

提供能源。Gunn 和 Gatehouse (1988) 对非洲粘虫 *Spodoptera exempta* 不同发育阶段飞行肌糖类及脂类的代谢途径中有关的酶活性研究结果表明，非洲粘虫在飞行过程中，糖类及脂类两种能源贮备物质对其飞行都相当重要，在整个生命活动中，糖类为成虫羽化及短距离的飞行提供能源，而脂类则在远距离的迁飞活动中起重要作用。沙地蟋蟀 *Gryllus firmus* 持续吊飞 4.5～7.7 h，甘油酯和碳水化合物含量都明显降低；从酶活性的研究结果看来，沙地蟋蟀飞行过程中主要的能源供应是脂肪(Zera *et al*.，1999)。

粘虫 *Mythimna separata* (Walker)是一种重要的禾谷类害虫，从田间观察及室内测试的结果都发现它具有极强的飞行和远距离迁飞能力(李光博等，1964；张志涛和李光博，1985)。通过电子显微镜对粘虫飞行肌的超微结构的观察也发现，它具有较短的肌节，较高的线粒体和横管含量，所有这些都是粘虫蛾强有力飞行的结构特征(罗礼智和李光博，1996)。曹雅忠等(1995)观测了粘虫在无补充营养连续吊飞条件下，飞翔后虫体重下降和脂肪消耗的情况。李克斌和罗礼智(1999)对常规饲养的不同日龄粘虫蛾飞行肌的酶活性进行测定，表明粘虫既可以利用糖类，也可以利用脂类作为飞行能源。但上述研究并没有涉及到粘虫在飞行过程中能源物质代谢酶的活性变化。本文就粘虫飞行过程中与飞行能源相关的几种酶的活性进行了测定与比较，以进一步明确粘虫飞行过程中的能源物质的动态利用情况。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

所用的粘虫成虫是从河南郑州采集的越冬代迁入成虫在室内繁殖 3 代后的成虫。幼虫用玉米苗饲养，密度为 150 头/箱(75 cm × 34 cm × 34 cm)，每天更换饲料。幼虫老熟后，在箱内加入 3 cm 厚含水量约 10% 的土粒供其化蛹、羽化。成虫羽化后，立刻配对置于直径 8.5 cm 高 20 cm 的塑料罩内，用 5% 的蜂蜜水饲养。饲养温度为(24 ± 1)℃，相对湿度为 70%，光周期为 L:D = 12:12。

1.2 实验处理

取羽化后 3 天的雌蛾进行吊飞处理。按不同的要求，分别吊飞 5 min，15 min，30 min，60 min，120 min；吊飞所用仪器为本单位研制的昆虫飞行数据微机采集分析系统。测试前先用乙醚轻度麻醉成虫，用小毛笔轻轻扫去胸腹部交接处背面的毛和鳞片，然后用 502 胶(北京化工厂出品)连接于吊环及飞行磨的吊臂上。测试温度为(20 ± 0.5)℃，相对湿度为 40%～60%，全暗条件(李克斌和罗礼智，1999)；吊飞完成后剪掉测试粘虫背部的吊环，立即将供试昆虫置于液氮中处死，并置液氮中保存备用。

1.3 酶活性及蛋白质含量的测定

将虫体从液氮中取出，去掉头、足、翅及腹部，仅留胸部进行测试。在冰冷的生理盐水中解剖出粘虫飞行肌的背纵肌，将所取背纵肌放入预先冷冻处理过的匀浆器中。加入冰冷的 2 mL 0.1 mol·L^{-1} 磷酸钾缓冲液(pH 7.3，其中含 2 mmol·L^{-1} 的 EDTA)，在冰浴中匀浆，然后将制备好的匀浆液在 4℃ 条件下以 14 000 × g 冷冻离心 10 min，取上清液进行酶活性测定(Zera *et al*.，1999)。

酶活性的测定用国产 72-3 型分光光度计在 25℃ 条件下进行，具体操作步骤参照 Zera 等(1999)的方法进行，蛋白质含量测定以牛血清蛋白为标准，用 Lowry 法进行。各种酶活性测定的反应体系如下：

3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH；E.C.1.2.1.12)：100 mmol·L^{-1} Tris-HCl(pH 8.5)，17 μmol·L^{-1} 砷酸钠，3.33 mmol·L^{-1} 盐酸胱氨酸，20 mmol·L^{-1} 氟化钠，3.33 mmol·L^{-1} NAD，5 μmol·L^{-1} 3-磷酸甘油；

3-磷酸甘油脱氢酶(GDH；E.C.1.1.1.8)：100 mmol·L^{-1} MOPS 缓冲液，pH 7.0，4 mmol·L^{-1} 磷酸二羟丙酮，150 μmol·L^{-1} NADH；

乳酸脱氢酶(LDH；E.C.1.1.1.27)：100 mmol·L^{-1} MOPS 缓冲液，pH 7.0，1 mmol·L^{-1} 氰化钾(KCN)，5 mmol·L^{-1} EDTA，150 μmol·L^{-1} NADH，2 mmol·L^{-1} 丙酮酸钠；

3-羟辅酶 A 脱氢酶(HOAD；E.C.1.1.1.35)：100 mmol·L^{-1} MOPS 缓冲液，pH 7.0，1 mmol·L^{-1} EDTA，1 mmol·L^{-1} KCN，150 μmol·L^{-1} NADH，100 μmol·L^{-1} 乙酰辅酶 A。

其中除了砷酸钠和氟化钠为国产分析纯试剂以外，其他试剂均为 Sigma 公司产品。

2 结果与分析

2.1 糖类代谢相关酶的活性变化

GAPDH 是反映糖酵解水平较具代表性的酶类之一，其活性水平往往代表糖酵解循环的活性高低(Beenakkers *et al*.，1984)。3 日龄雌蛾在吊飞 5 min 后该酶活性明显升高(图 1)，到 30 min 下降到一个较低的水平，然后再度回升。从结果中还可以看出，

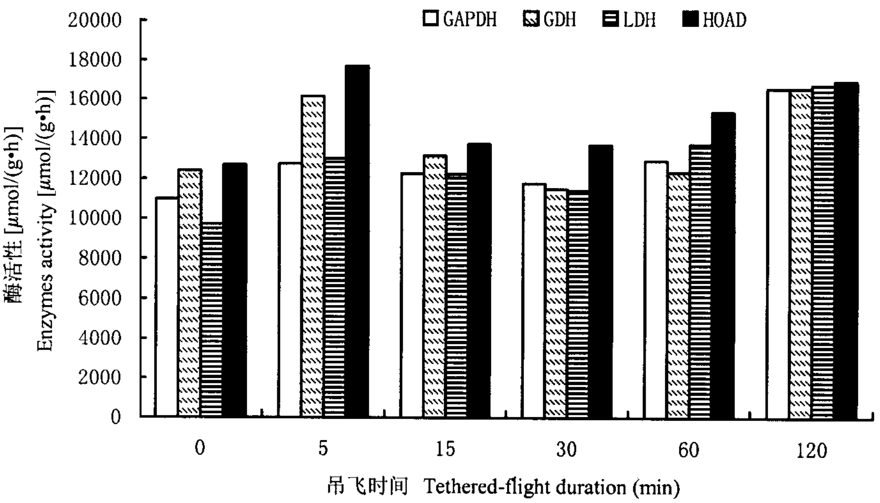

图1　粘虫不日龄雌蛾吊飞不同时间4种酶的活性变化

Fig. 1　Changes of activity of four enzymes at different tethered-flight duration in 3-day old female *M. separata*

吊飞过程中 GAPDH 的酶活性(0 ~ 120 min)始终高于静息状态(0 min,下同)的活性,表明粘虫在吊飞过程中糖类一直处于动用状态。

GDH 是昆虫体内一种较为特殊的酶,这种酶在一般的高等动物中含量较少。其作用是维持糖类代谢的高度有氧状态(Beenakkers *et al*.,1984)。该酶在吊飞过程的变化趋势与 GAPDH 相仿(图1),只是在吊飞5 min 内上升更为突出。表明在起始吊飞的5 min 内,粘虫的耗氧量急剧增加,此时极高的 GDH 活性可以维持粘虫糖类代谢高度有氧状态。吊飞达到2 h 后,该酶的活性再度达到起始吊飞5 min 内的状态。GDH 的活性在吊飞过程一起保持在较高的水平,这为粘虫迅速氧化由糖酵解产生的还原型辅酶Ⅰ(NADH),从而为加快糖代谢的速度提供了生化基础,也保证粘虫飞行肌高速的有氧代谢能力。

LDH 的活性高低可以反映动物体的无氧代谢能力(Beenakers *et al*.,1984)。3日龄粘虫雌蛾吊飞过程中 LDH 的变化与前两种酶的变化趋势相同(图1):吊飞5 min 时该酶活性上升迅速,明显高于静息状态($P < 0.05$),在吊飞15 ~ 30 min 内,该酶活性有所下降,到吊飞≥2 h 时,这种酶的活性再度升高,表明此时糖类的无氧代谢处于较高的水平。因此,粘虫在飞行过程中,除了可以进行高速有氧代谢以外,还具备一定的无氧代谢能力。而且这种能力与 GAPDH 的变化一致。说明粘虫飞行过程中,即使氧气的量供应不足,它也能维持高速度的糖类代谢水平。

2.2　脂肪酸β-氧化的关键酶 HOAD 的活性变化

HOAD 活性是衡量脂肪代谢水平高低的关键酶之一(Beenakkers *et al*.,1984)。其活性水平比肉毒碱酰基转移酶更能反映昆虫飞行肌动用脂肪的能力(Gunn and Gatehouse,1988)。测试结果表明(图1),在吊飞的初始5 min 内,此酶的活性达到最高点。并明显高于其他任何吊飞时间的活性($P < 0.05$)。吊飞15 min 后酶活性急剧下降,此时的酶活性水平与吊飞前的水平相差不大($P > 0.05$)。而后该酶的活性缓慢回升,到吊飞2 h 时其活性稍低于吊飞后5 min 的活性。从测试的结果还可以看出,HOAD 的活性在飞行后一直高于静息状态该酶的活性,表明粘虫在飞行过程中,脂类的动用一直存在于在飞行过程中,但在起始飞行过程中动用较多,而在以后的持续飞行过程中的动用量相对恒定。

2.3　吊飞过程中 HOAD∶GAPDH 的变化

HOAD∶GAPDH 的值是昆虫飞行中能量利用类型的重要指标,根据其比值的不同 Beenakkers 将昆虫飞行类型分为三类:远大于1.0 的为脂类利用型,远小于1 的为糖类利用型,接近1 的为能量利用混合型(Beenakkers,1969)。本项测试结果表明,粘虫蛾无论是在静息状态还是在吊飞过程中,HOAD∶GAPDH 的比值均略高于1(图2)。一方面说明粘虫飞行的能源物质种类利用属于混合型;另一方面,这两种酶高于1 的比值也表明,粘虫飞行过程中利用脂类的能力比利用糖类的能力要强。

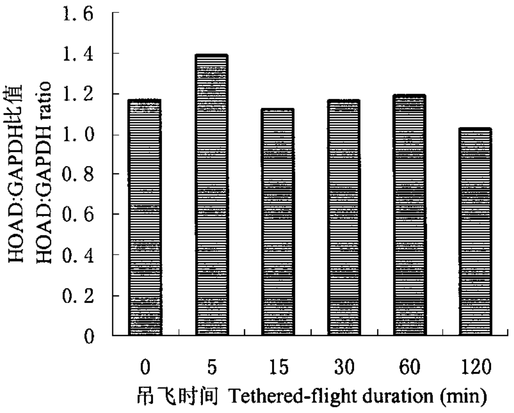

图 2 3 日龄吊飞不同时间 HOAD∶GAPDH

Fig. 2 Ratio of HOAD and GAPDH activity at different tethered-flight duration in 3-day old female *M. separata*

3 讨论

昆虫组织代谢强弱的变化与相关代谢途径酶的活性关系密切，这一点很早就被昆虫生理学家所认同。碳水化合物在昆虫的短距离飞行中起重要作用，在某些昆虫中是唯一的可以利用的能源物质，其中包括大多数的双翅目昆虫，膜翅目昆虫及某些鳞翅目昆虫（Steele，1981，1983；Wheeler，1989）。而其他的一些昆虫，包括飞蝗在内的迁飞昆虫，在飞行的起始阶段利用糖类，而持续飞行过程则转向利用脂类（Beenakkers *et al*.，1984）。有研究表明，在以利用脂类为主的昆虫中，当飞行的能源物质利用从糖类转变为脂类的时候，糖类并不是消耗完了，在能源的最后生成的 TCA 循环中，还需要糖类为其提供部分中间产物。Robinson 和 Goldsworthy（1976）认为，血淋巴中一定的糖水平可以为除飞行肌以外的其他组织，比如神经系统提供能量。而且在必要的时候，一定的糖类贮备还可以为昆虫紧急飞行提供能量。van Handel 等（1972）对亚热带粘虫 *Prodenia eridania* 的研究结果表明，这种昆虫能直接利用取食所获得的糖类而无需将其转化为脂肪作为能源底物。而飞蝗的飞行肌在利用甘油酯时，所产生的甘油也可以由脂肪体中的甘油激酶转变为海藻糖而直接进入糖酵解循环（van der Horst *et al*.，1983）。这种相似的代谢机制也可能存在于非洲粘虫中（Gunn and Gatehouse，1988）。现有的研究结果显示，粘虫飞行初期主要动用糖类作为飞行能源，同样它也能直接利用肠道中的糖类为飞行能源（王宗舜和欧阳迎春，1995）。van der Horst 等（1978）使用 C^{14} 标记海藻糖的方法，证明飞蝗在持续飞行期间能继续利用糖类提供约 1/4 的能源。Gunn 和 Gatehouse（1988）对粘虫幼虫体壁肌的酶活性的研究表明，幼虫肌肉的能量供应主要来源于脂肪，与糖类代谢相关酶的活性极低。从本实验的研究结果来看，粘虫除了在飞行初期利用糖类作为飞行能源以外，在持续飞行阶段糖类也起着相当重要的作用。尽管从糖类的贮备数量上来说，它不足以和脂肪相比，但是从我们以上的讨论结果来看，脂肪代谢产生的甘油以及从食物中取食的糖类都可以为糖类代谢提供代谢的物质基础。

对粘虫吊飞过程中酶活性的研究结果表明，粘虫在飞行过程中其能量代谢有以下特点：在吊飞的初始 5 min，所有的与糖代谢和脂肪代谢的酶活性都迅速升高，这段时期脂肪代谢的酶活性也完全被活化，HOAD 活性明显增强；但在随后的 5～60 min 持续吊飞期间几乎与能量代谢有关的酶活性都有所下降，表明此时飞行活动趋于平稳。吊飞中的粘虫具有极高的有氧代谢能力，也具备一定的无氧代谢能力。吊飞过程中 HOAD∶GAPDH 接近于 1，但稍大于 1，说明粘虫飞行过程中能源物质利用属于混合型，但动用脂肪的能力要比利用糖类的能力强。从粘虫蛾体内能源物质的储存情况来看，脂肪含量要比糖类高的多（李克斌和罗礼智，1998）；粘虫蛾具有很强的迁飞能力，在迁飞过程中可能获得补充营养，但在其长时间的远距离迁飞过程中的能源消耗要以脂肪为主。

参考文献（References）

Beenakkers AM，1969. Carbohydrate and fat as a fuel for insect flight: Acomparative study. *J. Insect Physiol*., 15(3): 353－361.

Beenakkers AMT，van der horst DJ，van Marrewijk WJA，1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem*., 14: 243－260.

Cao YZ，Luo LZ，Li GB，Hu Y，1995. The relationship between utilization of energy materials and sustained flight in the moths of oriental armyworm，*Mythimna separata*（Walker）. *Acta Entomologica Sinica*，38(3): 290－295.［曹雅忠，罗礼智，李光博，胡毅，1995. 粘虫飞翔能源物质及其消耗. 昆虫学报，38(3): 290－295］

Gunn A，Gatehouse AG，1988. The development of enzymes involved in flight muscle metabolism in *Spodoptera exempta* and *Mythimna separata*. *Comp. Biochem. Physiol*., 91B(2): 315－324.

Kammer AE，Heinrich B，1978. Insect flight metabolism. *Adv. Insect Physiol*., 13: 133－229.

Li GB，Wang HX，Hu WX，1964. Route of the seasonal migration of the Oriental armyworm moth in the eastern part of China as indicated by a three-year result of releasing and recapturing of marked moths. *Acta Phytophylacica Sinica*，3(2): 101－110.［李光博，王恒祥，胡文绣，1964. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验. 植物保护学

报,3(2)：101 – 110]

Li KB，Luo LZ，1998. Effects of larval rearing density on energetic reserves in the adults of Oriental armyworm *Mythimna separata* (Walker). *Acta Entomologica Sinica*，41(3)：250 – 257. [**李克斌,罗礼智**,1998. **粘虫幼虫密度对成虫能源物质含量的影响.昆虫学报**,41(3)：250 – 257]

Li KB，Luo LZ，1999. Activities of enzymes in flight muscle of pupal and adult Oriental armyworm，*Mythimna separata* (Walker). *Acta Entomologica Sinica*，42(1)：37 – 43. [**李克斌,罗礼智**,1999. **粘虫飞行肌中与能量代谢有关的酶活性研究.昆虫学报**,42(1)：37 – 43]

Luo LZ，Li GB，1996. Ultrastructure of flight muscle of adult Oriental armyworm *Mythimna separata* (Walker). *Acta Entomologica Sinica*，39(2)：141 – 148. [**罗礼智,李光博**,1996. **粘虫蛾飞行肌超微结构的研究.昆虫学报**,39(2)：141 – 148]

Rankin MA，Burchsted JCA，1992. The cost of migration in insects. *Annu. Rev. Entomol*.，37：533 – 559.

Robinson NL，Goldsworthy GJ，1976. Adipokinetic hormone and flight metabolism in the locust. *J. Insect Physiol*.，22：1 559 – 1 564.

Steele JE，1981. The role of carbohydrate metabolism in physiological function. In：Downer RGH ed. Energy Metabolism in Insects. New York：Liss. 101 – 134.

Steele JE，1983. Endocrine control of carbohydrate metabolism in insects. In：Downer RGH，Laufer H eds. Endocrinology of Insects. New York：Liss.

van der Horst DF，van Doorn JM，Beenakkers AB，1978. Dynamics in the haemolymph trehalose pool during flight of the locust，*Locusta migratoria*. *Insect Biochem*.，8：413 – 416.

van der Horst DF，Abbink JHM，van Doorn JM，1983. Glycerol dynamics and metabolism during flight of the locust，*Locusta migratoria*. *Insect Biochem*.，13：45 – 55.

van Handel E，Nayar JK，1972. Direct use of carbolhydrate during sustained flight in the moth *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem*.，2：203 – 208.

Wang ZS，Ouyang YC，1995. Carbohydrates mobilization and utilization during initial flight period in the moths *Mythimna separata* (Walker). *Acta Entomologica Sinica*，38(2)：146 – 151. [**王宗舜,欧阳迎春**,1995. **东方粘虫飞行初期糖类的动用和消耗.昆虫学报**,38(2)：146 – 151]

Wheeler CH，1989. Mobilization and transport of fuels to the flight muscles. In：Goldsworthy G，Wheeler C eds. Insect Flight. Boca Raton. FL：CRC Press. 273 – 303.

Zera AJ，Sall J，Otto K，1999. Biochemical aspects of flight and flightlessness in *Gryllus*：flight fuels，enzyme activities and electrophoretic profiles of flight muscles for flight capable and flightless morphs. *J. Insect Physiol*.，45(3)：275 – 285.

Zhang ZT，Li GB，1985. A study on the biological characteristics of the flight of the Oriental armyworm *Mythimna separata* (Walker). *Acta Phytophylacica Sinica*，12(2)：93 – 100. [**张志涛,李光博**,1985. **粘虫飞翔生物学特性初步研究.植物保护学报**,3(2)：93 – 100]

(责任编辑：袁德成)